

# 海藻乙醇提取物抗菌活性的研究<sup>\*</sup>

徐年军 范晓 韩丽君 林伟 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

**提要** 分属绿藻门、红藻门、褐藻门的海藻样品于 2000 年 5 月采于山东青岛和威海附近沿海,将海藻样品的乙醇提取物进行薄层层析分离和抗大肠杆菌、金黄色葡萄球菌活性测定。结果表明,抗大肠杆菌活性较强的海藻样品有:鸭毛藻、酸藻、松节藻和孔石莼的水相;抗金黄色葡萄球菌活性较强的提取物有:鸭毛藻、海黍子、松节藻、小粘膜藻的乙酸乙酯相以及酸藻的水相。从不同门类海藻的抗菌活性看,褐藻最强,红藻次之,而绿藻活性最弱。薄层层析分离得到 16 个层析带具有抗金黄色葡萄球菌活性,11 个层析带具有的抗大肠杆菌性。其中褐藻门的酸藻、海黍子的 3 个层析带具有很强的抗金黄色葡萄球菌活性,酸藻的 2 个层析带也能强烈地抑制大肠杆菌的生长。在同样的实验条件下,对常见抗生素进行的对照实验表明,这 5 条层析带的活性比常见的抗生素高。

**关键词** 海藻,抗菌活性,薄层层析(TLC)

中图分类号 R931.77

海藻活性物质的研究是现代海洋生物学研究的热点之一,从海藻中可以筛选、提取得到多种有抗肿瘤、抗氧化、抗细菌、抗真菌、抗病毒的活性物质(严小军等,1997;张新宇等,2000;徐年军等,2001;王广策等,2001)。海藻在海洋环境中生存,会受到外界生物的侵袭,在不断的进化过程中可能产生对各种微生物的抗性,国外对海藻抗菌活性的研究报道较多(Borowitzka,1995;Kumar *et al*,2000;Vlachos *et al*,1999;Tovar *et al*,2000),从海藻中可分离出许多有抗菌活性的化合物(Bennamara *et al*,1999)。Robles-Centeno 等(1996)报道运用薄层层析方法分离混合样品,然后分别测试各个层析带,能为鉴别海藻样品的化学性质和活性提供重要信息。本文采用薄层层析方法对山东沿海分布较丰富的十几种大型海藻进行了抗菌活性分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

海藻样品于 2000 年 5 月采于山东青岛和威海海水浴场附近沿海。将采集的鲜活海藻去除杂藻后,用淡水洗去附着生物,晒干,剪碎后各称取 30g。主要的实验海藻有绿藻门的刺松藻(*Codium fragile*)、浒苔(*Enteromorpha sp.*)、孔石莼(*Ulva pertusa*),红藻门的松节藻(*Rhodomela corfervoides*)、鸭毛藻(*Symphiodadia latiuscula*)、角叉菜(*Chondrus ocellatus*)、蜈蚣藻(*Grateloupiafilicina*),褐藻门的小粘膜藻(*Leathesia difformes*)、酸藻(*Desmarestia viridis*)、

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金重点项目,29932030 号;山东省自然科学基金项目,Q99E07 号。徐年军,男,出生于 1973 年 2 月,博士生,E-mail: xunianjun@263.net

收稿日期:2001-03-21,收修改稿日期:2001-12-28

海黍子(*Sargassum kjelimanianum*)。用于抗菌活性实验的菌种为革兰氏阳性的大肠杆菌 [*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers] 和革兰氏阴性的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* Rosenbach), 均购自中国科学院微生物研究所菌种中心, 培养基为 2 号培养基 (营养肉汁琼脂): 蛋白胨 10.0g, 牛肉提取物 3.0g, NaCl 5.0g, 琼脂 15.0g, 蒸馏水 1.0L, pH = 7.0。

## 1.2 方法

**1.2.1 提取** 海藻样品称量后用 95% 乙醇浸泡提取 3 天, 过滤, 再重复提取 3 天, 合并两次的提取液, 真空旋转蒸干, 得到黑褐色的固体浸膏, 称重。

**1.2.2 萃取** 将海藻粗提物加入 10 倍体积的蒸馏水, 充分溶解后, 用乙酸乙酯萃取, 得到低极性的乙酸乙酯相和高极性的水相部分, 分别蒸干, 称重。

**1.2.3 活性组分的 TLC 制备层析** 分别对各种海藻的不同极性组分进行抗菌实验后, 将活性较强的组分再分别进行细分离, 用制备薄层层析法(TLC)分离。根据各种组分的极性选择层析液, 如松节藻、鸭毛藻的水相用氯仿: 甲醇(3:2), 乙酸乙酯相用石油醚: 丙酮(2:1)层析分离, 海黍子用氯仿: 甲醇(5:1), 酸藻水相用氯仿: 甲醇(5:1), 乙酸乙酯相用石油醚: 丙酮(3:1)作层析液。用碘缸和石英紫外检测仪检测出特征带, 刮取特征带(特征带用层析后化合物移动的距离与溶剂移动距离的比值  $R_f$  表示)进行抗菌活性实验。

**1.2.4 抗菌实验** 采用双碟法(范秀容等, 1996)。大肠杆菌和金黄色葡萄球菌活化后分别在液体的培养基中培养 1 天, 吸取 2ml 倒入熔化的固体培养基中(42℃), 摇匀后倒入平板(培养皿中预先倒入 15ml 无菌培养基形成底层), 每个培养皿中倒入 10ml, 凝固后加上直径为 5.5mm 的滤纸片(滤纸片上预先用移液枪加上 50 $\mu$ l 的待测样品并放置 1 天以上至溶剂完全蒸发), 同时用  $3 \times 10^5$  IU/ml 的青霉素和氯霉素做阳性对照; 加入二氯甲烷溶剂的滤纸片做空白对照。上述每个样品设 2 个平行样, 结果取平均值。

## 2 结果

### 2.1 海藻提取物不同极性组分的抗菌活性

表 1 海藻提取物抗菌活性结果

Tab. 1 The results of antibacterial activities of seaweed extracts

海藻	提取物	含量(g/ml)	抑菌圈(mm)	
			大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
刺松藻 <i>Codium fragile</i>	乙酸乙酯相	0.147	0	7.5
	水相	0.346	0	0
浒苔 <i>Enteromorpha</i> sp.	乙酸乙酯相	0.081	0	8
	水相	0.305	0	0
孔石莼 <i>Ulva pertusa</i>	乙酸乙酯相	0.116	0	8.5
	水相	0.300	8.5	0
松节藻 <i>Rhodomela confervoides</i>	乙酸乙酯相	0.088	0	9
	水相	0.313	8.5	0

续表

海藻	提取物	含量(g/ml)	抑菌圈(mm)	
			大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
鸭毛藻 <i>Symphocladia latiuscula</i>	乙酸乙酯相	0.162	6.5	14
	水相	0.522	12	0
角叉菜 <i>Chondrus ocellatus</i>	乙酸乙酯相	0.023	0	0
	水相	0.157	0	0
蜈蚣藻 <i>Gratouopia filicina</i>	乙酸乙酯相	0.032	0	7
	水相	0.272	0	0
小粘膜藻 <i>Leathesia difformes</i>	乙酸乙酯相	0.102	0	9
	水相	0.462	0	0
酸藻 <i>Desmarestia viridis</i>	乙酸乙酯相	0.101	0	6.5
	水相	0.144	9	10
海黍子 <i>Sargassum kjedimianum</i>	乙酸乙酯相	0.032	0	10
	水相	0.164	0	0
空白对照			0	0
青霉素( $3 \times 10^3$ IU/ml)			10	39
氯霉素( $3 \times 10^5$ IU/ml)			25	39

采用加了滤纸片的培养皿培养 24h 后测定抑菌圈大小。表 1 结果表明, 抑制大肠杆菌活性较强的海藻样品有: 鸭毛藻的水相(12mm)、酸藻的水相(9mm)、松节藻和孔石莼的水相(8.5mm); 抗金黄色葡萄球菌活性较强的提取物有: 鸭毛藻的乙酸乙酯相(14mm)、酸藻的水相(10mm)、海黍子的乙酸乙酯相(10mm)、松节藻和小粘膜藻的乙酸乙酯相(9mm)。绿藻对两种细菌的抗菌活性较弱。红藻门的鸭毛藻、松节藻有较强的活性。褐藻门中, 酸藻的水相具有对两种细菌的活性, 小粘膜藻和海黍子的乙酸乙酯相对金黄色葡萄球菌有较强的活性。因此继续对鸭毛藻、松节藻、海黍子、酸藻、小粘膜藻进行 TLC 层析分离和抗菌活性的检测。

## 2.2 红藻薄层层析分离组分抗菌活性

将活性较高的鸭毛藻、松节藻粗提物萃取分成乙酸乙酯相和水相, 分别进行薄层层析(TLC)分离后测抗菌活性, 结果见表 2。

由表 2 可知, 鸭毛藻乙酸乙酯相的 1 个带( $R_f$  0.00)和水相的 2 个带( $R_f$  0.21,  $R_f$  0.33)、松节藻的乙酸乙酯相的 4 个带( $R_f$  0.00,  $R_f$  0.50,  $R_f$  0.60,  $R_f$  0.65)和水相的 1 个带( $R_f$  0.26)具有抗金黄色葡萄球菌活性。而鸭毛藻水相的 2 个带( $R_f$  0.21,  $R_f$  0.33)具有抗大肠杆菌活性。其中松节藻水相  $R_f$  0.26、乙酸乙酯相  $R_f$  0.65, 以及鸭毛藻水相  $R_f$  0.33 对金黄色葡萄球菌具有较强的抑制活性(抑菌圈直径分别为 9.5mm、9mm、8mm), 而没有很好抑制大肠杆菌的活性组分。

表 2 红藻薄层层析分离组分抗菌活性结果

Tab. 2 The results of antibacterial activities of the extracts of Rhodophyta

鸭毛藻				松节藻			
组分	层析带	抑菌圈( mm)		组分	层析带	抑菌圈( mm)	
		大肠杆菌	金黄色葡萄球菌			大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
乙酸乙酯相	$R_f$ 0.00	0	7.5	乙酸乙酯相	$R_f$ 0.00	0	7.5
	$R_f$ 0.50	0	0		$R_f$ 0.50	0	7
	$R_f$ 0.59	0	0		$R_f$ 0.60	0	7.5
	$R_f$ 0.61	0	0		$R_f$ 0.65	0	9
	$R_f$ 0.72	0	0		$R_f$ 0.73	0	0
	$R_f$ 0.84	0	0		$R_f$ 0.80	0	0
水相	$R_f$ 0.21	7	7.5	水相	$R_f$ 0.09	0	0
	$R_f$ 0.33	6.5	8		$R_f$ 0.26	0	9.5
	$R_f$ 0.48	0	0		$R_f$ 0.43	0	0

### 2.3 褐藻薄层层析分离组分抗菌活性

将3种褐藻:酸藻、海黍子、小粘膜藻进行薄层层析和抗菌活性实验(表3),结果表明,海黍子乙酸乙酯相的1个带( $R_f$  0.90)、酸藻乙酸乙酯相的2个带( $R_f$  0.00,  $R_f$  0.20)和水相的2个带( $R_f$  0.00,  $R_f$  0.14)以及小粘膜藻乙酸乙酯相的3个带( $R_f$  0.00,  $R_f$  0.43,  $R_f$  0.60)具有对金黄色葡萄球菌的活性。而海黍子乙酸乙酯相的2个带( $R_f$  0.29,  $R_f$  0.90)、酸藻乙酸乙酯相1个带( $R_f$  0.00)和水相的3个带( $R_f$  0.00,  $R_f$  0.14,  $R_f$  0.23)具有抗大肠杆菌的活性。其中对金黄色葡萄球菌抑制活性较强的有酸藻水相(33mm和17mm)、乙酸乙酯相(12mm)和海黍子(17.5mm),而能有效抑制大肠杆菌的有酸藻的水相(21mm和16mm)。3种绿藻中没有抗菌活性强的藻种。

表 3 褐藻薄层层析分离组分抗菌活性结果

Tab. 3 The results of antibacterial activities of the extracts of Phaeophyta

鸭毛藻				松节藻			
组分	层析带	抑菌圈( mm)		组分	层析带	抑菌圈( mm)	
		大肠杆菌	金黄色葡萄球菌			大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
酸藻	$R_f$ 0.00	8	8	海黍子	$R_f$ 0.29	6.5	0
乙酸乙酯相	$R_f$ 0.20	0	12	乙酸乙酯相	$R_f$ 0.38	0	0
	$R_f$ 0.44	0	0		$R_f$ 0.48	0	0
	$R_f$ 0.61	0	0		$R_f$ 0.56	0	0
	$R_f$ 0.80	0	0		$R_f$ 0.90	7	17.5
酸藻水相	$R_f$ 0.00	21	33	小粘膜藻	$R_f$ 0.00	0	7.8
	$R_f$ 0.14	16	17		水相	$R_f$ 0.33	0
	$R_f$ 0.23	6	0	$R_f$ 0.43		0	6.8
	$R_f$ 0.45	0	0	$R_f$ 0.56		0	0
	$R_f$ 0.61	0	0	$R_f$ 0.60	0	7.5	

### 3 讨论

比较三大类海藻的抗菌活性可以看出: 褐藻提取物的活性最高, 3 种褐藻提取物都具有较强的抗菌活性, 红藻的部分种类也有一定的活性, 而绿藻对两种细菌的抗菌活性较低。海藻提取物对不同细菌的活性不同, Kumar 等(2000)报道的 11 种海藻提取物中, 绿藻浒苔 (*Enteromorpha flexuosa*) 对一种植物致病菌 *Xanthomonas oryzae* 具有最大的抑制活性。

本文探索了不同海藻样品的薄层层析分离方法, 发现不同海藻样品的 TLC 分离需要不同的层析液, 但也有一定的共性, 如用石油醚: 丙酮(2: 1)分离红藻乙酸乙酯相具有较好的分离效果, 而用氯仿: 甲醇(3: 2)分离红藻水相也能得到较好的结果。Caccamese 等(1981)研究表明, 运用 TLC 分离后测定活性组分, 可以得到比直接测定粗提物更好的效果。同时, 运用 TLC 分离可显示在粗提物检测时被屏蔽的低活性组分, 如本实验中鸭毛藻、松节藻水相对金黄色葡萄球菌的活性。

实验还将几种抗生素对两种细菌的抑制活性进行了研究, 结果见表 4。

表 4 抗生素对两种细菌的抑制活性(抑菌圈直径 mm)

Tab. 4 The inhibition activities of some antibiotics to two species of bacteria(Diameter of inhibition circles, mm)

抗生素	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌
空白对照	0.0	0
妥布霉素	19.5	26
氨基青霉素	7.0	—
头孢唑啉	15.5	—
丁胺卡那	14.5	23
氯霉素	13.0	—
庆大霉素	15.0	24
卡那霉素	25.0	30
羧苄青霉素	8.8	—
新霉素	13.0	21
链霉素	14.0	24
痢特灵	14.0	20

本实验通过 TLC 分离得到几个有活性的组分, 其活性比相应的抗生素还高。如酸藻水相的 2 个组分对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 33mm ( $R_f$  0.00) 和 17mm ( $R_f$  0.14), 海葵子对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径为 17.5mm ( $R_f$  0.90), 而酸藻的水相对大肠杆菌的抑菌圈直径为 21mm ( $R_f$  0.00) 和 16mm ( $R_f$  0.14)。比较表 4 中各种抗生素对两种细菌的抑菌圈的大小, 可以推断, 酸藻和海葵子的活性组分的抑菌圈直径大于常见抗生素的, 其中可能含有某种抗菌的活性物质。

本文仅报道了对海藻粗提物的活性检测, 目前正在以本研究和抗肿瘤活性筛选结果为依据, 进行活性化合物的分离纯化和结构鉴定的工作, 以期找到活性先导化合物, 开发新的海洋药物。

### 参 考 文 献

王广策, 曾呈奎, 2001. 紫球藻两种藻红蛋白特性的比较研究—— $\gamma$  亚基在稳定藻红蛋白结构方面的作用. 海洋与湖沼,

32(6): 653—657

严小军, 秦松, 曾呈奎, 1997. 藻类分子生物技术两年评——与藻类活性物质研究有关的生物技术. 海洋与湖沼, 28(4): 440—445

张新宇, 王雷, 李光友等, 2000. 绿色巴夫藻硒多糖的提取、分离与纯化. 海洋与湖沼, 31(6): 643—646

范秀容, 李广武, 沈萍编, 1996. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 173—177

徐年军, 范晓, 韩丽君等, 2001. 山东沿海海藻抗肿瘤活性的筛选. 海洋与湖沼, 32(4): 408—413

Benmamoun A, Abourriche A, Berrada M *et al.*, 1999. Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochem*, 52: 37—40

Borowitzka M A, 1995. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *J Appli Phycol*, 7: 3—15

Caccamese S, Azzolina R, Furnari G *et al.*, 1981. Antimicrobial and antiviral activities of some marine algae from eastern Sicily. *Bot Mar*, 24: 365—367

Kumar K A, Rengasamy R, 2000. Antibacterial activities of seaweed extracts/fractions obtained through a TLC profile against the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Bot Mar*, 43: 417—421

Robles-Centeno P O, Ballantine D L, Gerwick W H, 1996. Dynamics of antibacterial activity in three species of Caribbean marine algae as a function of habitat and life history. *Hydrobiology*, 326/327: 457—462

Tovar C Z, Ballantine D L, 2000. Multiple antimicrobial activities of the marine alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Bot Mar*, 43: 233—238

Vlachos V, Critchley A T, Holy A V, 1999. Differential antibacterial activity of extracts from selected southern African macroalgal thalli. *Bot Mar*, 42: 165—173

## STUDY ON THE ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF THE ETHANOL EXTRACTS OF SEAWEED

XU Nian-Jun, FAN Xiao, HAN Li-Jun, LIN Wei, ZENG Cheng-Kui (C. K. Tseng)

(*Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

**Abstract** The ethanol extracts of seaweed belonging to Chlorophyta, Rhodophyta and Phaeophyta, collected from Shandong coast in May 2000, were assayed their activities against two kinds of bacteria of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. As a result, the water phase of extracts of *Symphycloadia latiuscula*, *Desmarestia viridis*, *Rhodomela confervoides* and *Ulva pertusa* showed activities against *Escherichia coli*. The EtOAc phase of extracts of *Symphycloadia latiuscula*, *Sargassum kjelimanianum*, *Rhodomela confervoides*, *Leathesia difformes* and the water phase of extract of *Desmarestia viridis* showed activities against *Staphylococcus aureus*. Brown algae had the highest activities, then red algae, and green algae had the lowest activities. Five species of seaweed, *Desmarestia viridis*, *Sargassum kjelimanianum*, *Leathesia difformes*, *Symphycloadia latiuscula* and *Rhodomela confervoides* showed high antibacterial activities. Thin layer chromatography (TLC) was used to separate the extracts of the five species of seaweed and each band was examined for their antibacterial activities. It turned out that 16 bands showed activities against *Staphylococcus aureus* and 11 bands showed activities against *Escherichia coli*. Three bands from *Desmarestia viridis* and *Sargassum kjelimanianum* had powerful activities against *Staphylococcus aureus* and two bands from *Desmarestia viridis* could inhibit the growth of *Escherichia coli* vigorously. Compared with some common antibiotics, the activities of these five bands from *Desmarestia viridis* and *Sargassum kjelimanianum* were stronger.

**Key words** Seaweed, Antibacterial activity, Thin layer chromatography (TLC)